

**This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- **BLACK BORDERS**
- **TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- **FADED TEXT**
- **ILLEGIBLE TEXT**
- **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- **COLORED PHOTOS**
- **BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS**
- **GRAY SCALE DOCUMENTS**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

(1)-1

(1)

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-70311 出願日
90080
(43) 公開日 平成7年(1995)3月14日 9/22

(51) Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 5 G 69/10	NRN			
C 0 7 H 15/04		F		
C 0 7 K 7/06		8318-4H		
7/08		8318-4H		
14/00		8318-4H		
審査請求 未請求 請求項の数4 O L (全 9 頁) 最終頁に続く				

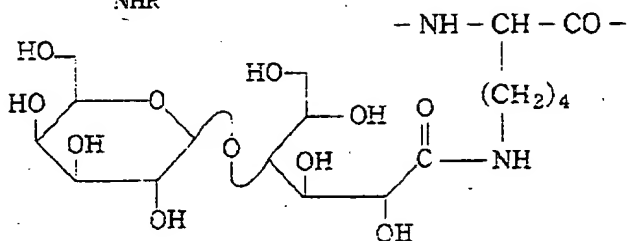
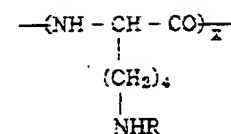
(21) 出願番号	特願平5-221032	(71) 出願人	000006877 山之内製薬株式会社 東京都中央区日本橋本町2丁目3番11号
(22) 出願日	平成5年(1993)9月6日	(72) 発明者	赤池 敏宏 東京都保谷市下保谷4-15-23
		(72) 発明者	後藤 光昭 神奈川県川崎市中原区上小田中211 光ハイツB203
		(74) 代理人	弁理士 長井 省三 (外1名)

(54) 【発明の名称】 ポリ-ε-置換-L-リジンのD-ガラクトピラノシル-グルコン酸誘導体

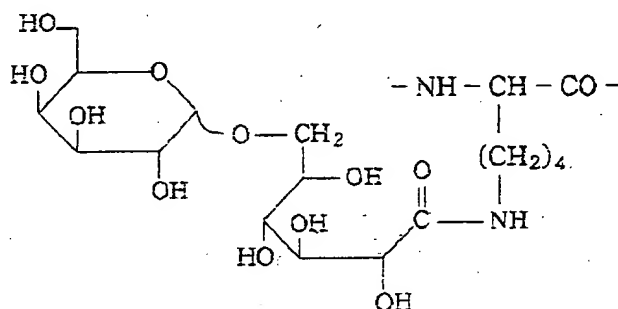
(57) 【要約】

【構成】 ポリ-L-リジンの一部又は全部を、D-ガラクトピラノシル-グルコンアミジル-L-リジン残基で置換した高分子化合物。
【効果】 この高分子化合物は、肝実質細胞を認識できる作用があり、DDS製剤開発用の担体として応用できる。

【化 1】



言たは



100021

で表わされる ϵ -D-ガラクトピラノシル-グルコンアミジル-L-リジン残基 (D-ガラクトピラノシルとグルコンアミジルの結合は α 1 \rightarrow 6 または β 1 \rightarrow 4 のいずれであってもよい) で置換したポリ-L-リジンの D-ガラクトピラノシル-グルコン酸誘導体 (ただし、N 末端の α -アミノ基は非置換であるか、上記 D-ガラクトピラノシル-グルコン酸で置換されるかのいずれであってもよい。)

【請求項2】 各構成単位の比率が、

L-リジン残基 0~98%

ε-D-ガクトピラノシル-グルコンアミジル-L-リ
ジン残基2~100%

ε-保護基-L-リジン残基 0~98%

であり、分子量2,000~117,000であることを特徴とする請求項1記載の誘導体。

【請求項3】 保護基がベンジルオキシカルボニル基である請求項1記載の誘導体。

【請求項４】 ポリー－エーリジンのアミノ基とＤ－ガラクトピラノシル－グルコン誘体のカルボキシ基を反応させることを特徴とする、請求項１記載の誘導体の製造方法。

【発明の詳細な説明】

70001

【産業上の利用分野】本発明は、医用高分子材料、殊にミサイル医薬担体として有用なポリ－Ｌ－リジンのＤ－ガラクトピラノシル－グルコン酸誘導体に関する。

(式中、Xは塩台度15～250であることを、Rは水素原子、または保護基を夫々意味する。)で示されるポリ-L-リジンポリペプチドにおいて、その構成ペプチドの一部または全部を

【化2】

【従来の技術】血清中の糖タンパクは、その末端に普遍的にシアル酸—ガラクトース—N—アセチルグルコサミンという糖構造が存在している。1960年代後半に G. Ashwell と A. Morell は、この糖構造が血清タンパクが血液中に安定に存在するために必要な構造であることをつきとめた。末端に存在するシアル酸を取り除くと、ガラクトースが新しい糖末端となる。シアル酸が除かれてガラクトースが露出した糖タンパクはアシアロ糖タンパクと呼ばれている。アシアロ糖タンパクは、この状態では血流中に安定に存在できなくなり、急速に血流中より消失する。消失したアシアロ糖タンパクのおよそ80%以上は肝臓に取り込まれることが判明している。

【0003】ところで、肝細胞の膜表面上には特異的糖認識レセプターが存在し、アシアロ糖タンパクはこのアシアロ糖タンパクレセプターを介して細胞内に取り込まれたものである。本発明者等は、肝細胞膜上のアシアロ糖タンパクレセプターに着目し、ミサイルドラッグ等に用いるドラッグキャリアー用の高分子材料の開発を目標として検討を重ね得た結果、先に酸性アミノ酸のグルタミン酸（またはアスパラギン酸）とガラクトサミンからなる高分子材料を開発した（特開平5-178988）。今回、本発明者等は更に鋭意研究した結果、新たに塩基性アミノ酸であるリジンにガラクトースを糖末端にもつものを導入した高分子がすぐれた性質を有するこ

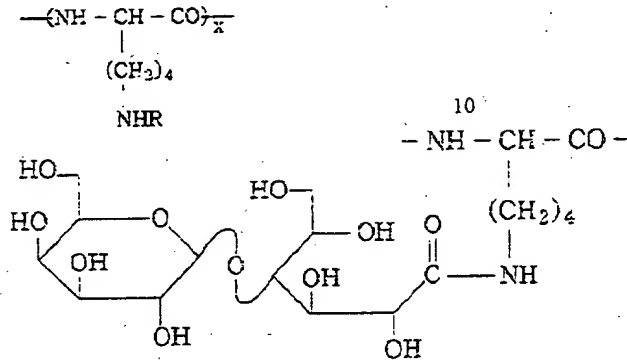
とを見出し本発明を完成した。

【0004】

【問題点を解決するための手段】すなわち、本発明は、
一般式

【0005】

【化3】

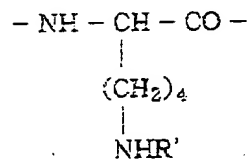


【0008】で表わされるε-D-ガラクトピラノシル-グルコンアミジル-L-リジン残基 (D-ガラクトピラノシルとグルコンアミジルの結合はα1→6またはβ1→4のいずれであってもよい) で置換したポリ-L-リジンのD-ガラクトピラノシル-グルコン酸誘導体 (ただし、N末端のα-アミノ基は非置換であるか、上記D-ガラクトピラノシル-グルコン酸で置換されるかのいずれであってもよい。) に関する。本発明のポリペプチドを更に説明すると以下の通りである。

構成単位：ε-保護基-L-リジン残基

【0009】

【化5】



【0010】 (式中、R' はアミノ基の保護基であり、特にベンジルオキシカルボニル基が好ましいが、他にも 30
以下に記載するものが好適なものとして挙げられる。

- ・p-ニトロカルボベンゾキシ基
- ・p-メトキシカルボベンゾキシ基

【0006】 (式中、Xは重合度15~250であることを、Rは水素原子、または保護基を夫々意味する。) で示されるポリペプチドにおいて、その構成ペプチドの一部または全部を

【0007】

【化4】

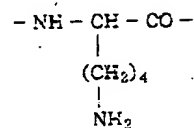
- ・p-フェニルアゾベンジルオキシカルボニル基
- ・p-(p'-メトキシフェニルアゾ)-ベンジルオキシカルボニル基
- ・p-クロルカルボベンゾキシ基
- ・p-ブロムカルボベンゾキシ基
- ・p-トリルオキシカルボニル基
- ・α-ナフチルメトキシカルボニル基
- ・p-ドデシルオキシベンジルオキシカルボニル基
- ・ベンズヒドロキシカルボニル基
- ・t-ブチルオキシカルボニル基
- ・フタリル基
- ・ホルミル基
- ・トリフルオロアセチル基
- ・p-トルエンスルホニル基 (トシル基)
- ・トリフェニルメチル基 (トリチル基)
- ・シクロヘキシルオキシカルボニル基 (カルボシクロヘキシルオキシ基)
- ・o-ニトロフェニルスルフェニル基
- ・t-アミルオキシカルボニル基
- ・エチルオキシカルボニル基
- ・イソプロピルオキシカルボニル基
- ・ジイソプロピルメトキシカルボニル基
- ・s-ブチルオキシカルボニル基

5

- ・シクロペンチルオキシカルボニル基
- ・3-メチル-3-ペンチルオキシカルボニル基
- ・1-メチル-1-シクロペンチルオキシカルボニル基
- ・2-ヨードエチルオキシカルボニル基
- ・1-アダマンチルオキシカルボニル基
- ・アリルオキシカルボニル基
- ・β-(p-トルエンスルホニル)-エチルオキシカルボニル基
- ・ベンジル基
- ・フェニルチオカルボニル基
- ・メチルチオカルボニル基
- ・o-ニトロフェノキシアセチル基
- ・クロルアセチル基
- ・ベンゼンスルホニル基
- ・ジベンジルホスホリル基類

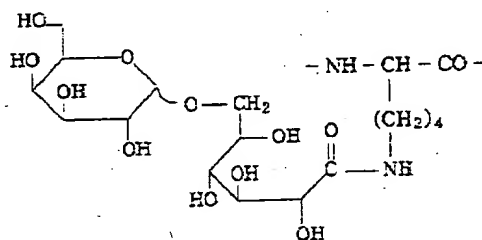
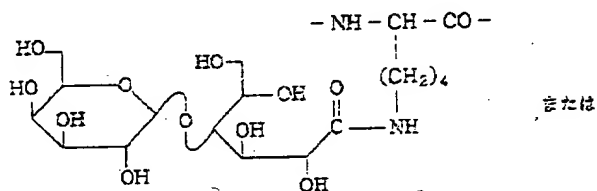
6

- ・トリアルキシルシリル基
- ・アリリデン基
- ・アセトアセチル基)
- 【0011】 L-リジン残基
- 【0012】
- 【化6】



10

- 【0013】 ε-D-ガラクトピラノシル-グルコンアミジル-L-リジン残基
- 【0014】
- 【化7】



【0015】配列状態：線状

分子量：2,000~117,000

重合度：15~250

構成単位の比率：

ε-保護基-L-リジン残基

L-リジン残基

0~98% 20

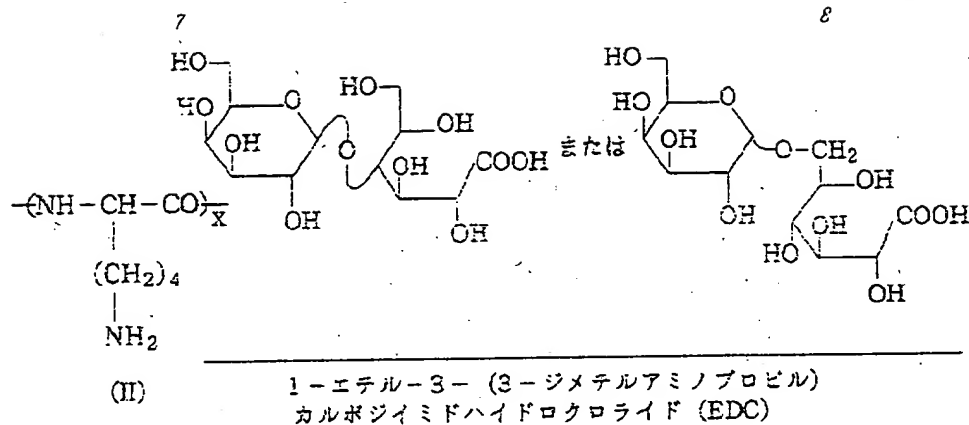
0~98%

【0016】

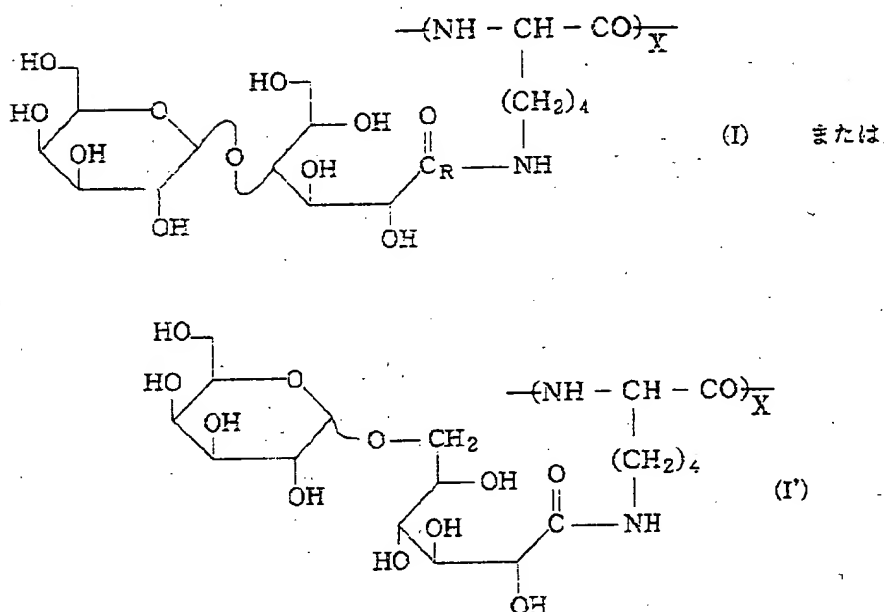
【化8】

ε-D-ガラクトピラノシル-グルコンアミジル-L-リジン残基 2~100%

本発明の化合物は、たとえば次式で示される方法により合成できる。



ポリリジンN末端の α 位またはポリリジン ϵ 位のアミノ基にペプチド結合により糖が入る。



【0017】ポリリジンにガラクトースを糖残基とするD-ガラクトピラノシル-グルコン酸を導入する方法は、ポリリジンのN末端の α 位またはポリリジン ϵ 位のアミノ基と、D-ガラクトピラノシル-グルコン酸のカルボキシル基とのペプチド化反応である。このペプチド化反応には、カルボキシル基またはアミノ基を活性化する方法および縮合剤の存在下に行う方法等が採用できる。

【0018】なお、本工程の原料化合物として使用するポリ- ϵ -置換-L-リジン (II) は、重合度がおおよそ15~250のものが用いられるが、これに限定されるものではない。後記実施例においては、たとえばポリ-L-リジン (pLysと略記する) は、重合度おおよそ15~250 (分子量約2,000~30,000) のものを用いた。

【0019】この中、カルボキシル基を活性化するペプチド化反応としては、D-ガラクトピラノシル-グルコン酸のカルボキシル基を、たとえばp-ニトロフェニルエステルの形態で活性化し、活性化化合物を分離した後、これにポリリジンを反応させる。この反応は、ジメチルホルムアミド (DMF)、テトラヒドロフラン (THF)、ジメチルスルホキシド (DMSO) 等の溶媒中、室温乃至冷却下で行われる。反応時間は数時間乃至数日間である。ペプチド化反応の進行率は、反応に伴って遊離するp-ニトロフェノールを定量することにより知ることができる。

【0020】つぎに、縮合剤を用いる方法としては、たとえばN,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC)、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドハイドロクロライド (EDC) 等の

存在下、ポリリジンとD-ガラクトビラノシル-グルコン酸とをカップリングさせる。この反応条件は、上述のカルボキシル基の活性化によるペプチデーションと同様である。生成した目的化合物 (I) または (I') は、たとえばセルロース透析膜を用いる透析により精製することができる。

【0021】

【発明の効果】本発明の目的化合物は、前述のように標的の生体細胞に対する認識作用が期待されるから、生体認識高分子として医療分野に応用することができる。また、本発明の目的化合物は、天然類似高分子であるポリアミノ酸誘導体であるから、生体分解性であり、また、水溶性である。したがってこの化合物は、ミサイルドラッグ等に用いるドラッグキャリアー用高分子材料として好適である。

【0022】

【実施例】つぎに実施例を挙げて本発明の目的化合物およびその製造方法を更に説明する。また、原料化合物である pLys の製造方法を参考例として示す。なお、以下参考例及び実施例において原料化合物及び目的化合物の名称に対し、下記の略記を用いる。

Cbz-Lys-NCA: ϵ -N-カルボベンゾキシー-L-リジン-N-カルボキシアミノ酸無水物

Cbz-Lys : ϵ -N-カルボベンゾキシー-L-リジン

pCbz-Lys : ポリ- ϵ -N-カルボベンゾキシー-L-リジン

pLys-LA : ポリ-L-リジン-D-ガラクトビラノシル-グルコン酸誘導体

LA10~70% : ポリ-L-リジンの側鎖アミノ基に対するD-ガラクトビラノシル-グルコン酸のモル比添加率 (10~70%)

【0023】参考例

(1) Cbz-Lys-NCAの合成

10gの ϵ -Cbz-Lys (東京化成) を100mlのテトラヒドロフランに溶解し、50℃に加温する。これにトリフォスゲンの等モル量を加え、50℃で1時間反応させた。反応溶液を室温まで冷却した後、300mlのヘキサンを加えて-20℃で一昼夜放置した。沈澱を濾取し、再びテトラヒドロフラン-ヘキサンから再結晶した (収量8g)。

(2) pCbz-Lysの合成 [M/I=20の場合 (M:モノマー, I:重合開始剤)]

18gのCbz-Lys-NCA (0.058mol) を100mlのテトラヒドロフランに溶解し、20分の1モルのベンジリアミン (314mg) を添加して、3昼夜反応させた。反応液をエーテル600mlにあげ、激しく攪拌しながら、3時間放置した。得られた沈澱は、酢酸エチル/ヘキサンから再結晶した (収量10g)。

(3) pLysの合成

10gのpCbz-Lysをジオキサン/塩化メチレンの300mlに溶解し、25% HBr/CH₃COOHの90mlを添加して、激しく攪拌しつつ1時間反応させた。反応液をヘキサン1lにあげ、沈澱を濾取した。沈澱を再びヘキサンに懸濁させ、3時間激しく攪拌させた。沈澱を濾取し、直ちに乾燥させた (収量5g)。

【0024】実施例1

pLys-LAの合成 (LA10%の場合)

2gのpLys [0.017mol; ポリ-L-リジンにおけるモノマーリジン中のアミノ基に対するモル数 (以下実施例2~4においても同様)] をTEMED緩衝液 (50mM テトラメチレンエチレンジアミン, pH 4.7) 30mlに溶解し、4-O- β -D-ガラクトビラノシル-グルコン酸 (商品名 ラクトビオン酸, 東京化成) の0.61gとEDCの0.26gを添加して3昼夜、室温で反応させた。反応終了後、反応液を透析チューブ (スペクトラム, 分子量カット3500) に移し、30lの蒸留水に対して透析を行った。透析終了後凍結乾燥を行って目的物を得た (収量1.2g)。

【0025】実施例2

pLys-LAの合成 (LA20%の場合)

2gのpLys (0.017mol) をTEMED緩衝液 (50mMテトラメチレンエチレンジアミン, pH 4.7) 30mlに溶解し、4-O- β -D-ガラクトビラノシル-グルコン酸の1.22gとEDCの0.52gを添加して3昼夜、室温で反応させた。反応終了後、反応液を透析チューブ (スペクトラム, 分子量カット3500) に移し、30lの蒸留水に対して透析を行った。透析終了後凍結乾燥を行って目的物を得た (収量1.4g)。

【0026】実施例3

pLys-LAの合成 (LA30%の場合)

2gのpLys (0.017mol) をTEMED緩衝液 (50mMテトラメチレンエチレンジアミン, pH 4.7) 30mlに溶解し、4-O- β -D-ガラクトビラノシル-グルコン酸の1.83gとEDCの0.78gを添加して3昼夜、室温で反応させた。反応終了後、反応液を透析チューブ (スペクトラム, 分子量カット3500) に移し、30lの蒸留水に対して透析を行った。透析終了後凍結乾燥を行って目的物を得た (収量1.7g)。

【0027】実施例4

pLys-LAの合成 (LA70%の場合)

2gのpLys (0.017mol) をTEMED緩衝液 (50mM テトラメチレンエチレンジアミン, pH 4.7) 30mlに溶解し、4-O- β -D-ガラクトビラノシル-グルコン酸の4.26gとEDCの1.82gを添加して3昼夜、室温で反応させた。反応終了

11

後、反応液を透析チューブ（スペクトラム、分子量カット3500）に移し、301の蒸留水に対して透析を行った。透析終了後凍結乾燥を行って目的物を得た（収量1.3g）。

【0028】上記、実施例において説明した合成物（pLys-LA）の糖導入の確認および糖導入率の決定は下記のとおり行った。

（試料の調製）TEMED緩衝液（50mM, pH4, 7）にポリリジン2g（リジンモノマーとして0.017mol）を溶かし、側鎖アミノ基の0.1倍、0.2倍、0.3倍、0.7倍のD-ガラクトピラノシル-グルコン酸、用いた糖類の0.8倍molのEDCを続けて溶解させた。引き続き、室温で3昼夜、反応させた後、水で透析し、凍結乾燥によって試料を調製した。

【0029】上記縮合法により、側鎖アミノ基の0.1倍、0.2倍、0.3倍および0.7倍のD-ガラクトピラノシル-グルコン酸を加えてカップリングさせて得られた誘導体（pLys-LA）の¹H-NMRスペクトルを後記図1、図2、図3および図4に示す。各図から明らかな様に各試料ともに4ppm付近に糖のピークが観察され、糖がポリマー側鎖中に導入されたことが確認された。また、図から明らかなように、D-ガラクトピラノシル-グルコン酸の使用量に対応して、各々糖類の置換割合6.3% [pLys-LA (10) : 実施例

12

1], 8.9% [pLys-LA (20) : 実施例2], 14.0% [pLys-LA (30) : 実施例3] および18.0% [pLys-LA (70) : 実施例4] の化合物が得られた。

（糖導入率の決定）LA導入率は、NMRの解析によって行った。別紙のNMRチャートにおいて2.92PPM付近の強いシグナルは、 ϵ CH₂によるもので積分比は2となる。次に4.22PPM付近は骨格CHによるもので積分比は1となる。また、3.45から4.69PPMのシグナルは、LA糖鎖によるものであり、積分比21X分となる。各シグナルの積分曲線（後記図1～4中に、波線で示した。）よりプロトン積分比（後記図1～4中に、数値で示した。）を求めた。実際に得られた積分比とこれらシグナルの比2:21X+1の関係からLA導入量が計算できる。

【図面の簡単な説明】

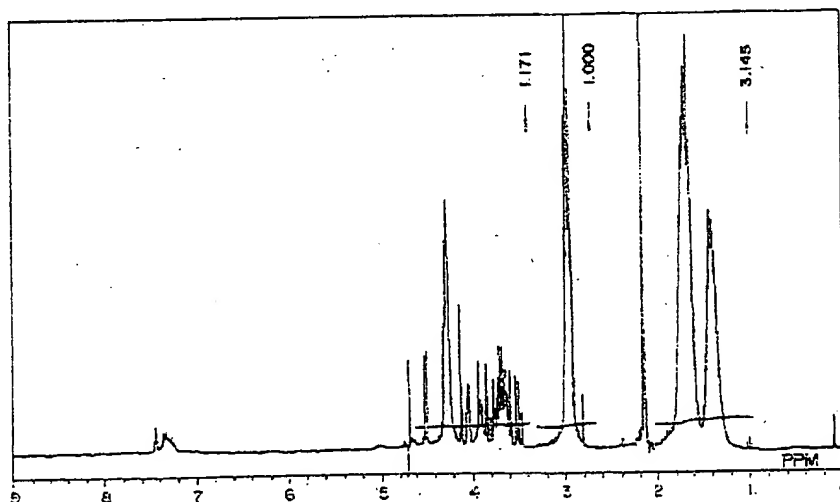
【図1】実施例1により得られた化合物の¹H-NMRスペクトルを示す。

【図2】実施例2により得られた化合物の¹H-NMRスペクトルを示す。

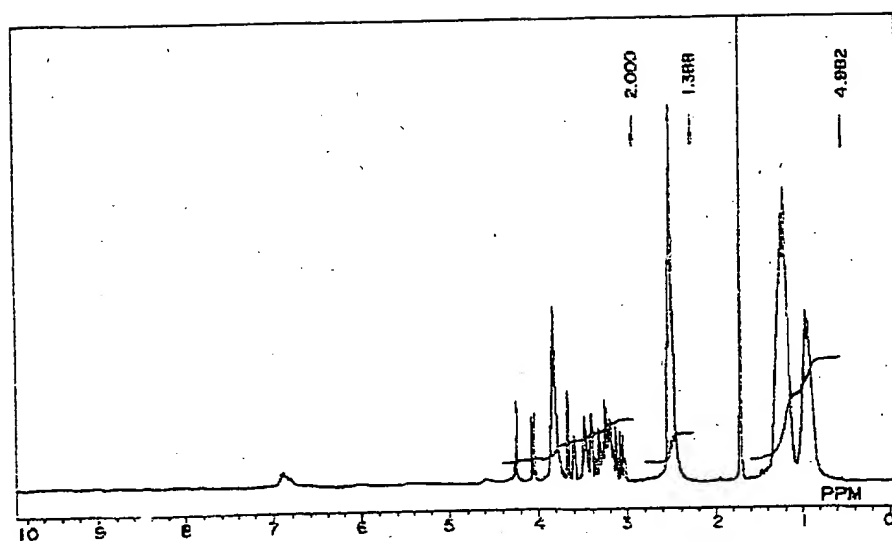
【図3】実施例3により得られた化合物の¹H-NMRスペクトルを示す。

【図4】実施例4により得られた化合物の¹H-NMRスペクトルを示す。

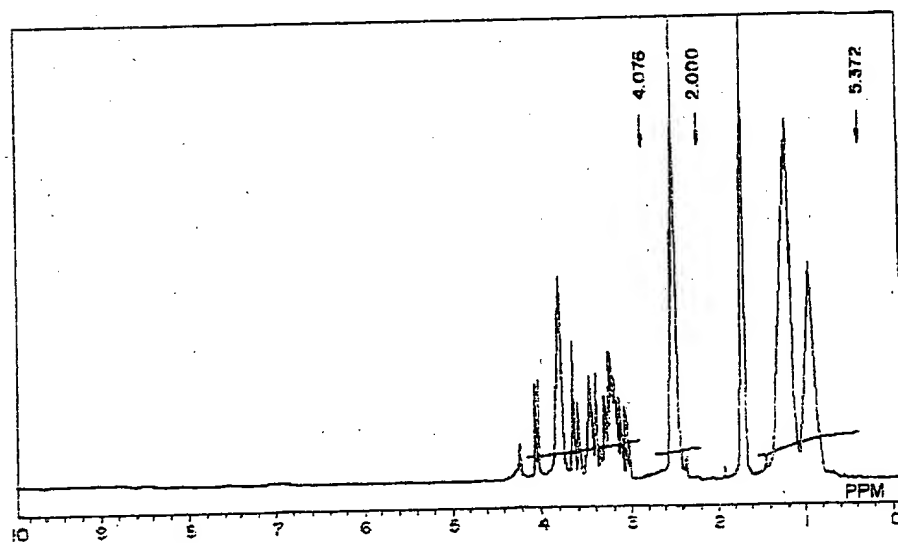
【図1】



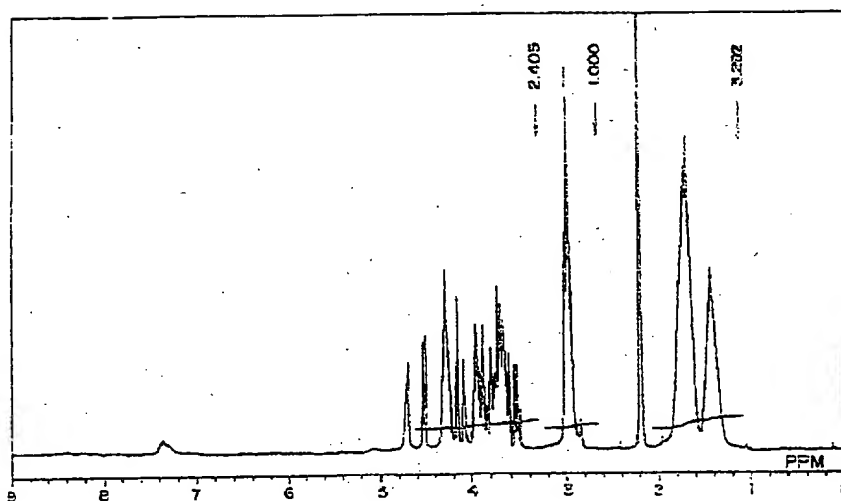
【図2】



【図3】



【図 4】



フロントページの続き

(51)Int. Cl.⁶
C 0 8 G 69/48

識別記号
NRH

序内整理番号

F I

技術表示箇所